

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN”**

Realizado por:

**SOFÍA NICHOLE ALMEIDA CRUZ**

Director del proyecto:

**Dr. Juan Carlos Navarro, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Quito, 5 de agosto de 2020**

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN  
DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, SOFÍA NICHOLE ALMEIDA CRUZ, con cédula de identidad # 1725803736, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

172580373-6

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN”**

Realizado por:

**SOFÍA NICHOLE ALMEIDA CRUZ**

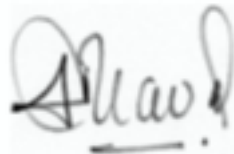
como requisito para la obtención del Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

ha sido dirigido por el profesor

**JUAN CARLOS NAVARRO**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Navarro', is centered on the page. The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath the name.

**FIRMA**

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

**LINO ARISQUETA**

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ**

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante  
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 5 de agosto de 2020

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

**DEDICATORIA**

A todos los científicos cuyos descubrimientos y arduo trabajo contribuyen a mejorar la vida de los  
seres humanos.

# **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de valiosas personas. Es un placer reconocer a todos los que me han apoyado:

Al doctor Juan Carlos Navarro, mi tutor, por su confianza, optimismo y dedicación.

A los doctores Scott Weaver, Kenneth Plante y Jessica Plante por su iniciativa en esta investigación.

Estoy particularmente agradecida con Msc. Divya Mirchandani por su tutela en el laboratorio y con Ayman Ahmed, por su colaboración y consejos que me inspiraron en el camino de la ciencia.

A PhD. Adeola Fowotade, University College Hospital (Ibadán – Nigeria).

A los departamentos de Relaciones Internacionales de la UISEK y la UTMB.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Ambientales de la UISEK por su excelente trabajo pedagógico.

A mi familia y amigos.

A mis padres, por su infaltable amor y apoyo incondicional, les debo más que todas las oportunidades que me han permitido.

Finalmente, a Dios, que hizo esto posible a través de todas estas grandiosas personas.

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

La presente Tesis de Grado ha sido realizada bajo el Programa de Investigación en  
**BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES APLICADOS A LA GESTIÓN  
AMBIENTAL Y BIOTECNOLOGÍA**

Línea de Investigación

**BIOMEDICINA, ENFERMEDADES EMERGENTES Y SALUD AMBIENTAL**

Financiado por la Dirección de Investigación e Innovación en el

**Proyecto P011617\_2 denominado**

**Eco-epidemiología *in silico* de Enfermedades Emergentes**

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## *Resumen*

El virus del Zika ha circulado en África durante décadas, sin embargo, actualmente hay escasos datos de la población general. En Nigeria, al igual que en los demás países africanos, la infección por Zika a menudo es confundida con otras enfermedades, debido a que provoca síntomas iniciales leves similares a los causados por otros virus de su familia (Flaviviridae), con los cuales comparte una alta identidad genética. Esta hace que la reactividad cruzada antigénica entre los flavivirus sea otro motivo que contribuye a la dificultad del diagnóstico de laboratorio de la infección por ZIKV en regiones endémicas. Las cepas africanas de Zika no se han asociado con síntomas similares a defectos congénitos como en Sudamérica, por lo que se le ha restado importancia a su diagnóstico y vigilancia.

Considerando estas preocupaciones, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la prevalencia de Zika entre las mujeres embarazadas de la región de Ibadán, suroeste de Nigeria, y distinguir la seropositividad de Zika con Dengue-1, Dengue-2, Fiebre Amarilla y Chikungunya, mediante el Ensayo de Inhibición de Hemoaglutinación.

Se analizaron 81 muestras de suero sanguíneo anti Zika NS-1 IgM e IgG positivas, provenientes de mujeres embarazadas de Ibadán, suroeste de Nigeria; por medio del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación. El ensayo reveló un 14.81% de seropositividad para Zika, 30.86% para Dengue-1, 30.86% para Chikungunya, 8.64% para Dengue-2 y 1.23% para Fiebre Amarilla. Sin embargo, el método tiene ciertas limitaciones y se requieren estudios adicionales para confirmar estos resultados y proveer una tasa de seropositividad de Zika definitiva.

**Palabras Clave:** Virus Zika, flavivirus, reactividad cruzada, Inhibición de la Hemaglutinación, seropositividad, Nigeria



# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## *Abstract*

The Zika virus has been circulating in Africa for decades; however, there is currently a lacking of data from the general population. Zika infection is often confused with other diseases due to the similarity of its symptoms to those caused by other viruses in its family (Flaviviridae), with which it shares a high genetic identity, which makes antigenic cross-reactivity between flaviviruses to be another reason that contributes to the difficulty of laboratory diagnosis of ZIKV infection in endemic regions. African strains of Zika have not been associated with symptoms similar to fetal birth defects as in South America, therefore, its diagnosis and surveillance has been downplayed.

Considering these concerns, the main objective of this study was to assess the prevalence of Zika among pregnant women in the Ibadan region, South West Nigeria, and to distinguish Zika seropositivity with Dengue-1, Dengue-2, Yellow Fever, and Chikungunya, using the Hemagglutination Inhibition Assay. 81 blood serum samples that were anti Zika NS-1 IgM and IgG positive, from pregnant women in Ibadan, South West Nigeria; were analyzed by the Hemagglutination Inhibition assay. The assay revealed 14.81% seropositivity for Zika, 30.86% for Dengue-1, 30.86% for Chikungunya, 8.64% for Dengue-2 and 1.23% for Yellow Fever. Nevertheless, the method has certain limitations and further studies are required to confirm these results and provide a definitive rate of Zika seroprevalence among the population of Ibadan.

**Keywords:** Zika virus, flavivirus, cross reactivity, Haemagglutination Inhibition, seroprevalence, Nigeria

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## *Introducción*

El Zika (ZIKV) es un arbovirus perteneciente a la familia Flaviviridae (género Flavivirus) similar al virus del Dengue, el West Nile, los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el virus de la Fiebre Amarilla y otros (Noor & Ahmed, 2018). La palabra arbovirus es un acrónimo de **AR**tropod **BO**rne **V**irus. Es una denominación práctica y epidemiológica para referirse a cualquier virus que se mantiene en la naturaleza principalmente, o en gran medida, a través de la transmisión biológica entre hospedadores vertebrados susceptibles por artrópodos hematófagos, o menos frecuente, por transmisión transovárica y posible venérea en artrópodos. Los virus se multiplican y producen viremia en los vertebrados, se multiplican en los tejidos de los artrópodos, y se transmiten a los nuevos vertebrados por las picaduras después de un período de incubación extrínseca (Barret & Weaver, 2012). Las infecciones humanas de arbovirus se manifiestan con síntomas que incluyen encefalitis, fiebre y mialgias, artritis, exantema o fiebre hemorrágica (Barret & Weaver, 2012).

El virus del Zika es transmitido por mosquitos del género *Aedes* (Noor & Ahmed, 2018). Esta especie de mosquitos se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales, y permite a los Arbovirus mantenerse en la naturaleza a través de complejos ciclos selváticos, peri-domésticos y urbanos que involucran vectores y vertebrados reservorios, siendo los humanos hospedadores incidentales (Opayele, Adekunle, Ibrahim, & Olaleye, 2017). El Zika también es capaz de transmitirse verticalmente de una madre embarazada a su embrión, principalmente si el virus infecta a la mujer durante el primer período de gestación. Además, este virus también se puede transmitir por contacto sexual (Noor & Ahmed, 2018).

Los humanos pueden infectarse con el virus en hábitats selváticos después de una picadura de mosquito o si hay propagación de un mosquito infectado desde hábitats selváticos (**Figura 1**) a áreas rurales/urbanas (Basu & Tumban, 2016).

## SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

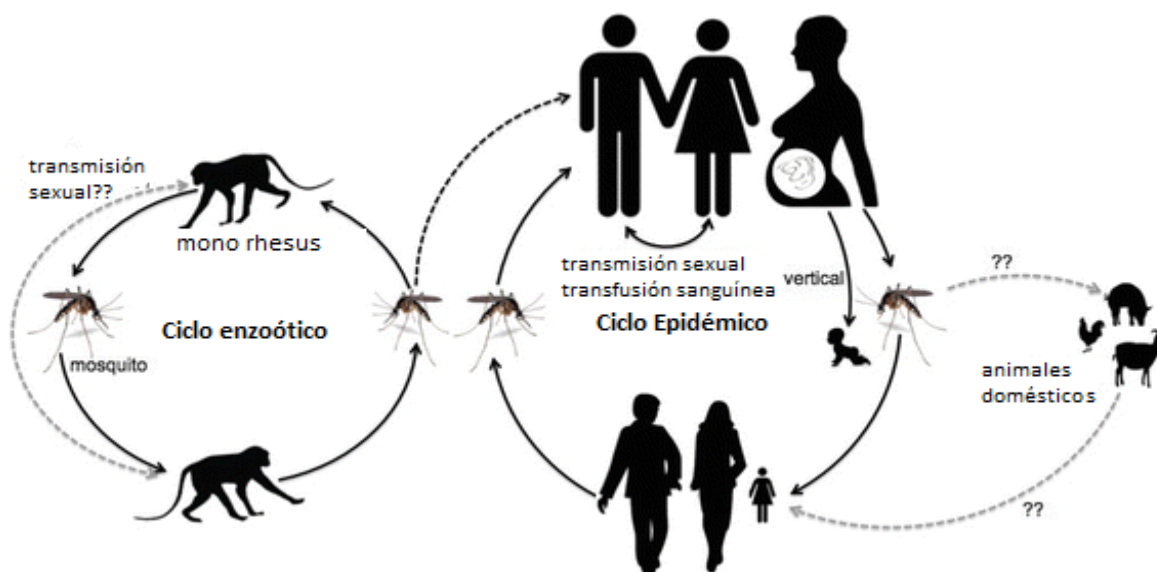


Figura 1. Ciclo Selvático de transmisión de Zika (Basu & Tumban, 2016)

Línea negra punteada en la mitad: propagación de un mosquito infectado proveniente de hábitats selváticos a áreas rurales/urbanas. Línea gris punteada a la izquierda con signo de interrogación: No se sabe si el virus puede transmitirse sexualmente entre monos. Línea gris punteadas a la derecha con signo de interrogación: No se sabe si el virus puede ser transmitido por mosquitos entre animales domésticos y humanos.

El ZIKV se aisló por primera vez en el bosque de Zika en Uganda en 1947 (Dick G, 1952). Un segundo linaje de ZIKV, un linaje asiático, fue descubierto en mosquitos *Aedes aegypti* en Malasia en 1966 (Marchette, Garcia, Rudnick, 1969). Luego de muchos años, causó un brote sin precedentes en las islas de la región del Pacífico en el 2013-2014 y posteriormente en las Américas en 2015. La epidemia de Zika 2015-2016 en Brasil se asoció con malformaciones congénitas llamadas “Síndrome de Zika Congénito” y algunos casos de síndrome de Guillain-Barré en adultos (Pedroso et al., 2019).

La infección es asintomática en la mayoría de los casos, pues solo uno de cada cuatro pacientes infectados presenta síntomas; incluso si surgen los síntomas, se superan rápidamente. Algunos síntomas incluyen fiebre baja, erupción maculopapular, artritis, dolor de cabeza o hiperemia conjuntiva y a menudo son similares a los del dengue y el chikungunya (Noor & Ahmed, 2018). La incidencia del Síndrome de Zika Congénito fue más alta en el noreste de Brazil. En Asia y África, donde el virus circuló durante mucho más tiempo que en las Américas,

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

las infecciones no se han relacionado con el desarrollo de Síndrome de Zika Congénito; solo se han informado casos esporádicos (Pedroso et al., 2019). Esto se debe a una diferente capacidad en las cepas de Zika africanas y asiáticas para infectar y lisar el trofoblasto placentario humano según un estudio realizado en el 2018 (Sheridan et al., 2018). Genéticamente, los aislamientos de ZIKV se han agrupado en dos linajes principales (= genotipos), africano y asiático, siendo el linaje africano ancestral al linaje asiático (Mathé et al., 2018; Sheridan et al., 2018). No obstante, las cepas del linaje asiático y las del linaje africano tienen una habilidad de replicación similar. La infección con cepas del linaje Africano al comienzo del embarazo provoca un efecto citopático (lisis) más severo, el cual probablemente resulta en la pérdida del embarazo, en lugar de permitir un mayor desarrollo fetal con daño cerebral acompañante (Sheridan et al., 2018).

El virus del Zika posee un genoma de ARN de sentido positivo, no segmentado y de cadena única, de aproximadamente 11 kb que codifica una poliproteína que incluye tres proteínas estructurales: cápside, pre membrana y envoltura y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (Shiryaev & Strongin, 2010; Singh et al., 2016). Las proteínas no estructurales juegan un rol vital en la replicación y producción de una respuesta inmune mediada por células (Shiryaev & Strongin, 2010)

Al igual que la mayoría de los arbovirus, el ZIKV tiene la propiedad de aglutinar los eritrocitos de mamíferos y aves debido a las proteínas que posee en su capa externa llamadas Hemaglutininas. Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hirst en 1941 (Hirst, 1941), y Hallauer en 1946 fue el primero en reportar hemaglutinación en arbovirus (Hallauer, 1946). Hallauer declaró que había obtenido un antígeno aglutinante de cepas viscerotrópicas de la fiebre amarilla. La capacidad de hemaglutinación es inhibida por el antisuero contra los virus dentro del mismo serogrupo. La seroreactividad contra virus de serogrupos distintos es generalmente débil (Barret & Weaver, 2012). Según Calisher, un serogrupo corresponde a dos o más virus, distintos uno del otro de acuerdo a criterios cuantitativos serológicos (que haya una diferencia de cuatro

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

veces o más entre los títulos homólogos<sup>1</sup> y heterólogos<sup>2</sup> de ambas muestras de suero) en una o más pruebas, pero relacionados entre sí o con otros virus mediante algún método serológico.

La reactividad cruzada antigénica entre los flavivirus es bien conocida (Calisher et al., 1989; Filipe, Martins, & Rocha, 1973; Wen & Shresta, 2019), ocurre cuando dos epítomos distintos son estructuralmente similares y, por lo tanto, son reconocidos por el mismo anticuerpo. ZIKV comparte una alta identidad de secuencia de proteínas con DENV, lo que dificulta el diagnóstico de laboratorio de la infección por ZIKV en regiones endémicas de flavivirus (Mathé et al., 2018). Además, ZIKV pertenece al serogrupo de Spondweni, éste incluye al virus Spondweni, con el cual ZIKV ha sido históricamente mal identificado y sus enfermedades diagnosticadas erróneamente debido a su reactividad cruzada serológica y presentaciones clínicas similares. La única forma de distinguir entre los virus Zika y Spondweni en regiones donde ambos circulan es confirmando una reacción monotípica a un ensayo serológico dado, mediante aislamiento del virus o por detección de ácidos nucleicos virales por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Haddow & Woodall, 2016). Los anticuerpos anti ZIKV se detectan por primera vez cuando la fiebre desaparece, generalmente dentro de los 5 a 10 días posteriores a la infección, y pueden persistir durante muchos años. Los anticuerpos son de tipo IgM durante 1–7 semanas después de la infección; posteriormente son de tipo IgG, los cuales aparecen 2–3 semanas después de la infección (Barret & Weaver, 2012). La inhibición de la hemaglutinación (HI), los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y las pruebas de neutralización se pueden utilizar para detectar anticuerpos séricos de los pacientes. Sin embargo, estos ensayos dependen de la disponibilidad de virus y/o antígenos (Barret & Weaver, 2012); además de que se ven altamente afectados por la reactividad cruzada (Steinhagen et al., 2016).

---

<sup>1</sup> Títulos de anticuerpos contra un mismo virus (Freeman et al., 2016).

<sup>2</sup> Títulos de anticuerpos contra un virus distinto (Freeman et al., 2016).

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

Aunque el ZIKV se conoce desde hace décadas, existen pocos datos contemporáneos sobre la prevalencia del ZIKV en África. Hay una escasez de datos de la población general y particularmente de las mujeres embarazadas. A la luz del potencial de defectos congénitos graves causados por el ZIKV, la vigilancia entre las mujeres embarazadas es crucial para la evaluación de riesgos y la preparación para la salud pública en los países africanos. Mathé, et al., (2018) encontraron una baja seroprevalencia anti - ZIKV entre mujeres (10%) usando ELISA basado en ZIKV NS1 en el centro-norte de Nigeria. Otu et al., (2020) encontraron una seropositividad del 20% para el Zika utilizando casetes de detección rápida de inmunocromatografía de flujo lateral, en el sudeste de Nigeria; pero no pudieron excluir la reactividad cruzada con otros flavivirus como el dengue y la fiebre amarilla.

Los hallazgos de Mathé, et al., muestran que la población del centro-norte de Nigeria es en gran medida inmunológicamente susceptible al ZIKV, lo que refuerza la importancia de su vigilancia en África.

Las muestras de suero sanguíneo analizadas en este estudio provienen de 198 participantes que fueron positivas para los anticuerpos IgM e IgG de entre un total de 373 mujeres embarazadas examinadas en el University College Hospital en Ibadán, Nigeria para detectar el virus Zika. 198 positivas de un total de 373 equivale al 53% de seropositividad, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos por (Mathé et al., 2018) y (Otu et al., 2020), quienes encontraron una seropositividad menor, del 10 y 20% respectivamente.

De acuerdo con lo arriba señalado, la hipótesis de este trabajo plantea que: *Menos del 30% de las 81 muestras analizadas son anti ZIKV positivas. La alta seropositividad del primer tamizaje realizado en Nigeria, se debe a una reactividad cruzada con los flavivirus Dengue-1, Dengue-2, West Nile y Fiebre Amarilla. El ensayo de Inhibición de Hemoaglutinación servirá para diferenciar estos virus de acuerdo a los títulos de anticuerpos.*

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

Por ello, el objetivo principal de este estudio es evaluar la prevalencia de Zika entre las mujeres embarazadas de la región de Ibadan, Nigeria y distinguir la seropositividad de Zika con Dengue-1, Dengue-2, West Nile, Fiebre Amarilla y Chikungunya, mediante el Ensayo de Inhibición de Hemoaglutinación.

## *Materiales y Métodos*

Se analizaron 81 muestras provenientes de Ibadán, Nigeria, por medio del ensayo de Inhibición de Hemaglutinación (HI). El proceso consistió en cuatro etapas principales: toma de muestras, preparación de muestras, ensayo HI, dentro del cual se realizaron tres procesos consecutivos: titulación de antígeno, Screening y titulación End Point; y finalmente, interpretación de los resultados (**Figura 3**). Cada uno de estos procedimientos se describe más a profundidad a continuación.

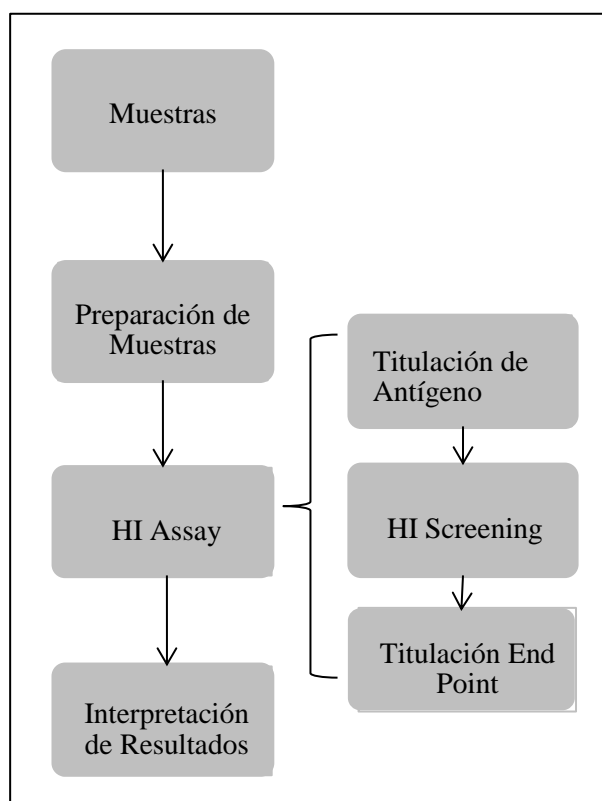


Figura 2. Flujograma del proceso de análisis de muestras

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## Área de estudio

La ciudad de Ibadán ( $7^{\circ}23'47''\text{N } 3^{\circ}55'0''\text{E}$ ) está localizada al suroeste de Nigeria y es la capital del estado de Oyo. Tiene una población de 2.550.593 habitantes y un área total de 3080 km<sup>2</sup>, lo que la convierte en la tercera ciudad más poblada y la más grande del país por área geográfica (**Fig. 2**). Los habitantes de la ciudad pertenecen principalmente a la etnia Yoruba.

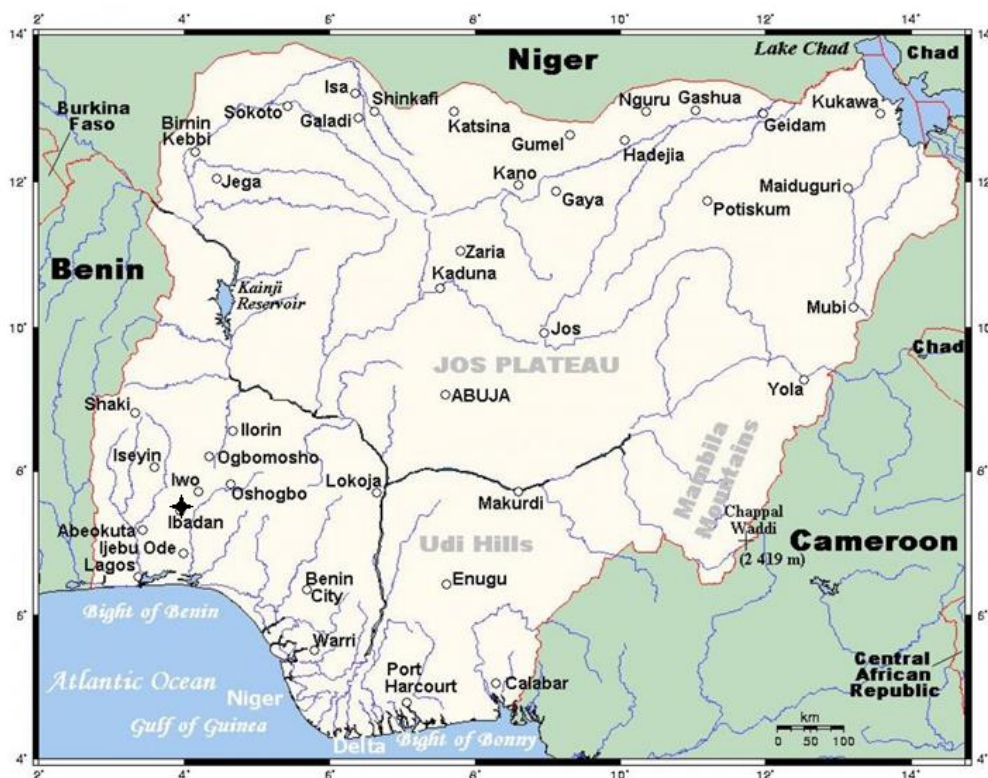


Figura 3. Ubicación de Ibadán, Sureste de Nigeria, localidad del hospital de toma de muestras analizadas en este estudio.

Su clima es tropical de sabana con una estación húmeda prolongada y las temperaturas son relativamente constantes durante todo el año. La precipitación total media para Ibadán es 1420.06 mm, en aproximadamente 109 días. Hay dos picos para la lluvia, junio y septiembre. La temperatura máxima media es  $26.46^{\circ}\text{C}$ , mínima  $21.42^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa es del 74.55%.

Ibadán es la cuarta mayor economía de Nigeria. Las principales actividades incluyen agricultura, comercio, empleo en el servicio público, trabajo en fábricas y sector de servicios /



## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

producción terciaria, entre otras; es un punto de tránsito prominente entre la región costera y las zonas del interior del país.

Ibadán es sede de numerosas instituciones de educación superior, entre ellas, la Universidad de Ibadán, que es la principal universidad de Nigeria. Otras instituciones notables en la ciudad incluyen The University College Hospital (UCH), siendo este el primer hospital universitario en Nigeria, y el aclamado internacionalmente Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA).

Nigeria por su parte, es la economía más grande de África y el séptimo país más poblado del mundo, con una densidad de 200 millones de personas en un área de 920,000 km<sup>2</sup>. A pesar de esto, Nigeria tiene un índice de pobreza del 50%, con 102.407.327 personas viviendo en la pobreza extrema. De acuerdo con los reportes de World Bank (2018), esto representa el 14.8% de la población global en situación de pobreza extrema.

### **Muestras**

Las muestras de suero sanguíneo provienen del University College Hospital, Ibadán - Nigeria, donde, en el año 2019, un total de 373 mujeres embarazadas fueron examinadas para detectar los anticuerpos IgM e IgG del virus Zika por el método de ELISA basado en la proteína no estructural 1 (NS-1). Las muestras de 175 participantes fueron negativas para los anticuerpos IgM e IgG, mientras que 46 participantes fueron positivas para los anticuerpos IgM e IgG, de las cuales 3 estaban en su primer trimestre, 15 en el segundo trimestre, 26 en el tercer trimestre y se desconocía el trimestre de 2 participantes. 105 participantes fueron positivas solo para anticuerpos IgM, de las cuales 5 estaban en su primer trimestre, 33 en su segundo trimestre, 66 en el tercer trimestre y el trimestre de 1 era desconocido. 24 participantes fueron positivas solo para IgG, 12 estaban en su segundo trimestre, 11 estaban en el tercer trimestre y se desconocía el trimestre de 1 participante. 1 participante en su segundo trimestre fue equívoca tanto para IgG como para IgM. 17 participantes fueron equívocas para IgM, de las cuales 4 estaban en el

## SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

segundo trimestre y 13 en el tercer trimestre. 5 participantes fueron IgM positivas y equívocas para IgG, de las cuales 1 estaba en el primer trimestre, 3 en el tercer trimestre y se desconoce el trimestre para 1 participante. La avidéz de IgG se llevó a cabo para 46 participantes que fueron positivas para el anticuerpo IgG. 32 tenían infecciones recientes, 1 tenía una infección pasada y 13 eran equívocas (**Tabla 1**).

No se tiene más información demográfica ni clínica de las pacientes.

Las 198 muestras positivas fueron enviadas al laboratorio del World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses (WRCEVA) en la University of Texas Medical Branch (UTMB), Estados Unidos, con el cual la UISEK mantiene un convenio de investigación e intercambio. Allí se analizó una submuestra de 81 sueros del total por medio del ensayo de Inhibición de Hemaglutinación.

**Tabla 1. Positividad de ELISA anti-ZIKV IgM e IgG entre mujeres embarazadas de acuerdo a su trimestre de embarazo, University College Hospital, Ibadán, Nigeria, 2019.**

	Trimestre				Total
	1er	2do	3er	?	
<b>IgM, IgG</b>	3	15	26	2	46
<b>IgM</b>	5	33	66	1	105
<b>IgG</b>	0	12	11	1	24
<b>IgM equívoca</b>	0	4	13	0	17
<b>IgM, IgG eqívc</b>	1	0	3	1	5
<b>IgMeq, IgG eq</b>	0	1	0	0	1
<b>Total</b>	9	65	119	5	<b>198</b>

### Preparación de Muestras

Las muestras fueron inactivadas a 56°C por 1 hora en baño maría antes de ser abiertas para eliminar potenciales patógenos.

Posteriormente, las muestras se trataron con acetona al 100% enfriada a -20°C. Esto se realiza con el objetivo de precipitar proteínas, concentrar y, posteriormente, rediluir, y así eliminar posibles interferencias de la actividad hemaglutinante, de acuerdo con Casals & Clarke (1958). Las proteínas son insolubles en acetona, especialmente a bajas temperaturas, otras

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

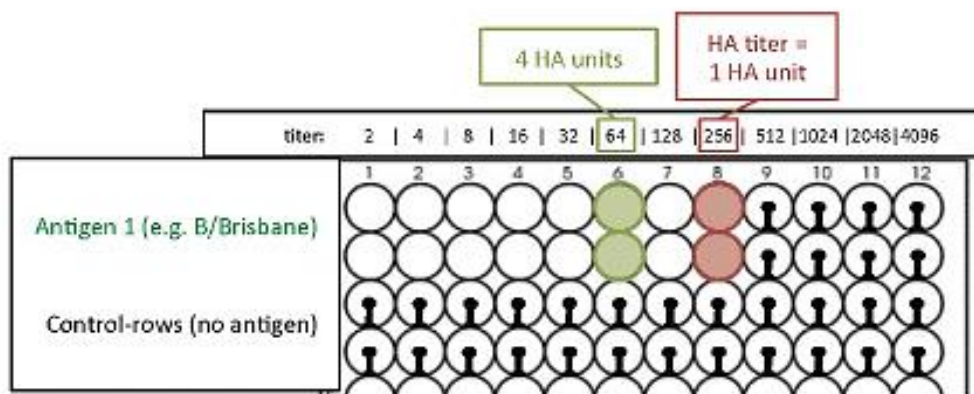
moléculas que pueden interferir en el ensayo son solubles y se eliminan. Las aglutininas del suero se remueven mediante adsorción con eritrocitos de ganso antes de su uso en las pruebas (Casals & Clarke, 1958). La sangre de ganso en buffer Alsevers, obtenida de Lampire Biological Products, se centrifugó a 1600 rpm por 10 minutos, se aspiró el buffer y se lavó con solución salina al 0.85% mezclando suavemente, centrifugando por 5 minutos y eliminando el sobrenadante. Este proceso se realizó dos veces, luego se añadió buffer Borato Salino (BABS), se centrifugó por 10 minutos y se descartó el sobrenadante dejando glóbulos rojos empacados (packed RBCs). A cada suero extraído con acetona se añadieron 30  $\mu$ l de packed RBCs para adsorber cualquier posible agente hemaglutinante que pudiera interferir con los resultados. La adsorción tuvo lugar durante 30 minutos, a 4°C, con agitación ocasional. Después de lo cual los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 1.600 rpm y se descartaron los glóbulos rojos.

### **Ensayo de Inhibición de Hemaglutinación**

Cada preparación de antígeno produce una cantidad diferente de antígeno, con propiedades como el pH óptimo que varía algunas veces para diferentes cepas del mismo antígeno viral. Dependiendo de la calidad de la sangre del ganso, que varía con cada lote, la fuerza de la hemaglutinación también puede diferir. Según la OMS, la cantidad estándar utilizada para el ensayo de HI es de 4 unidades de HA por 25  $\mu$ L. La cantidad óptima de antígeno requerida para la hemaglutinación se mide mediante el ensayo HA (ensayo de titulación de antígeno). El último pocillo en el que se produce la hemaglutinación completa es el punto final de valoración de HA y contiene 1 unidad de HA. Debido a las diluciones al doble del antígeno, dos pocillos por delante del punto final de valoración de HA, el título corresponde a 4 unidades de HA (Kaufmann et al., 2017).

Los antígenos fueron obtenidos de la colección de WRCEVA en la UTMB.

## SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

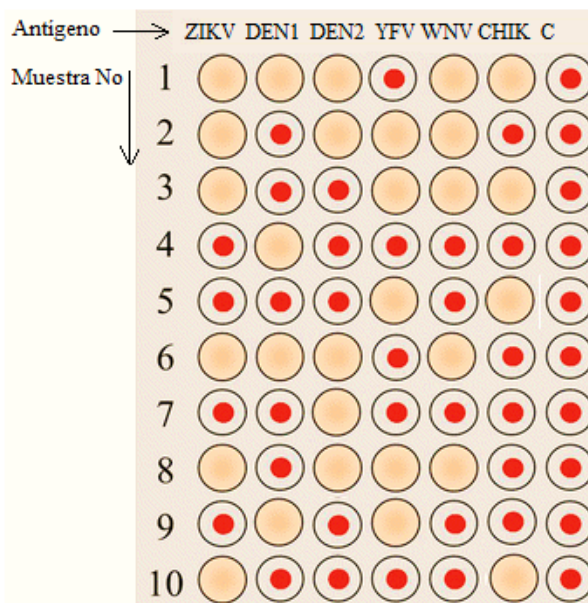


**Figura 4.** Diagrama de titulación de antígeno (Kaufmann et al., 2017)

Posteriormente, las muestras se llevaron a una prueba de selección (Screening) con un panel compuesto por 6 antígenos de arbovirus: Zika (ZIKV), Dengue-1 (DENV-1), Dengue-2 (DENV-2), Fiebre Amarilla (YFV), Chikungunya (CHIKV) y West Nile (WNV). En una placa de 96 pocillos se colocaron 25  $\mu$ l de muestra en cada fila para cada uno de los antígenos a ser probados, así como para el control. 25  $\mu$ l de solución de 4U de antígeno se añadieron en cada columna para cada una de las muestras, excepto para el control al que se le agregaron 25  $\mu$ l de BABS. Finalmente se añadió una solución de eritrocitos en buffer del pH óptimo correspondiente a cada antígeno. 50  $\mu$ l de eritrocitos de ganso en buffer Dextrosa Gelatina Veronal (DGV) por cada 2ml de buffer de pH.

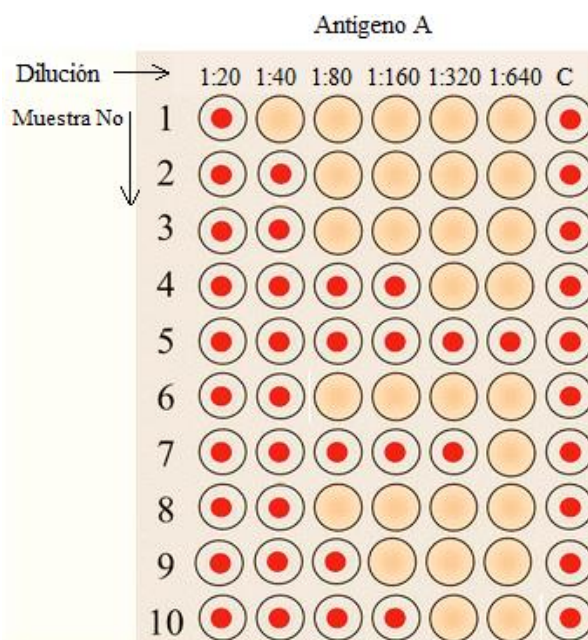
Los resultados positivos son aquellos en donde se neutralizan las 4U de antígeno por producirse la unión antígeno-anticuerpo. Los glóbulos rojos de ganso permanecen libres y se sedimentan en el pozo de la microplaca formando un botón bien definido idéntico al control (**Figura 4**). Cuando no se produce la unión antígeno-anticuerpo, los antígenos se unen a los glóbulos rojos de ganso, promoviendo la aglutinación de esas células. Entonces, la muestra se considera negativa (Casals & Clarke, 1958).

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**



**Figura 4. Diagrama de prueba de selección (Screening)**

La titulación End Point de las muestras positivas se llevó a cabo para todos los antígenos (excepto West Nile, para el que solo se hizo un screening), según el método de Casals & Clarke adaptado para microplacas (Shope, 1963). Se realizaron 5 diluciones seriales 1:1 del suero cuya dilución inicial era de 1:20 (**Figura 5**). La dilución más alta de suero que previene la hemaglutinación corresponde al título HI del suero.



**Figura 4. Diagrama de titulación End Point**

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## Interpretación de Resultados de la titulación End Point

Los resultados se interpretaron de acuerdo con Casals & Clarke, 1958: La inhibición de la hemaglutinación está indicada por una reacción negativa (botón de células) y el título de HI se toma como la dilución más alta de cada suero que causa la inhibición completa o casi completa de 4 unidades de antígeno (**Figura 3**). Para que una prueba se considere completamente satisfactoria, todos los controles de células y suero deben ser negativos y cada titulación final de antígeno debe mostrar la presencia de 4 a 8 unidades de antígeno.

El título de HI se expresa como el recíproco de la dilución de suero más alta que muestra una inhibición completa de la aglutinación.

Las muestras que tenían 1:20 títulos no se consideraron positivas.

Se consideró la reactividad cruzada en las muestras positivas para más de un Flavivirus. Así pues, el virus con el título más alto se consideró positivo, y se consideró reactividad cruzada al o los antígenos con dos títulos menos en comparación al positivo (Calisher et al., 1989). Los resultados de reactividad cruzada no se contaron como positivos.

Para CHIKV se consideraron positivos todos los resultados a partir de los títulos de 1:40, puesto que CHIKV pertenece al género Alphavirus, no hay reactividad cruzada con Flavivirus.

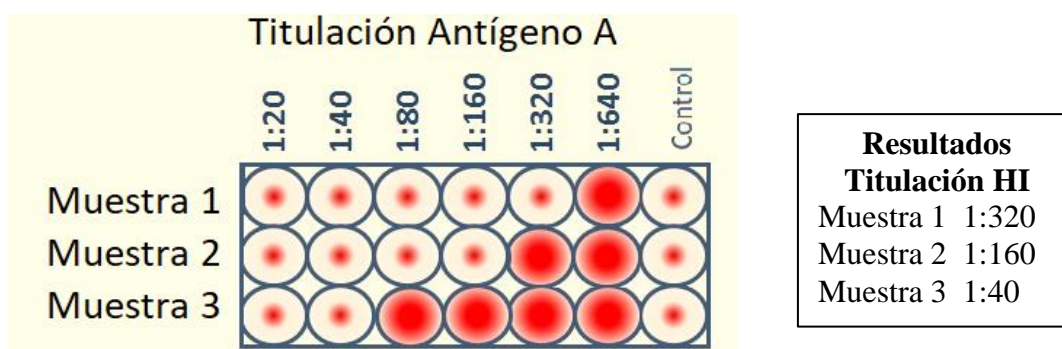


Figura 5. Titulación HI realizada en este estudio. El título de HI se toma como la dilución más alta de cada suero que causa la inhibición completa de la hemaglutinación.

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## Resultados

### “Screening” o “tamizaje”

81 muestras provenientes de mujeres embarazadas fueron analizadas en un screening inicial por medio del ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) para encontrar anticuerpos contra Zika, Dengue-1, Dengue-2, Chikungunya y Fiebre Amarilla. A 45 de estas muestras se les realizó el screening contra el virus West Nile (WNV). Las que resultaron positivas se llevaron posteriormente a titulación, a excepción de WNV.

Un total de 58 personas (71.60%) tenían anticuerpos contra al menos uno de los arbovirus utilizados en la prueba y 23 (28.40%) fueron negativas para todos los virus (**Tabla 2**). Los porcentajes de sueros positivos fueron los siguientes: Dengue-1 (56.79%), Chikungunya (32.10%), Zika (55.56%), Dengue-2 (41.98%) y Fiebre Amarilla (22.22%). De las 45 muestras analizadas para West Nile, un 68.89% fueron positivas; como se muestra en la **Tabla 3**.

45 muestras fueron positivas para Zika. 16 de estas fueron positivas también para Fiebre Amarilla, 40 para Dengue-1, 30 para Dengue-2, 25 para West Nile y 19 para Chikungunya. Lo que puede ser observado en la **Tabla 4**.

**Tabla 2. Resultados totales de Inhibición de la Hemaglutinación (Screening). Total de muestras positivas para al menos un arbovirus (Dengue-1, Chikungunya, Zika, Dengue-2, West Nile y Fiebre Amarilla) o negativas para todos los arbovirus.**

Screening		
	Frecuencia	%
<b>Negativo</b>	23	28.40
<b>Positivo</b>	58	71.60
<b>Total</b>	81	100

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

**Tabla 3. Resultados de Inhibición de Hemaglutinación (Screening) para Dengue-1, Chikungunya, Zika, Dengue-2, West Nile y Fiebre Amarilla en 81 muestras de suero humano**

	<b>Den-1</b>		<b>Chik</b>		<b>Zika</b>		<b>Den-2</b>		<b>YFV</b>		<b>WNV*</b>	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
<b>Negativo</b>	35	43.21	55	67.90	36	44.44	47	58.02	63	77.78	14	31.11
<b>Positivo</b>	46	56.79	26	32.10	45	55.56	34	41.98	18	22.22	31	68.89

\* 45 de las 81 muestras fueron probadas para WNV

**Tabla 4. Comparación de positividad de Zika con Fiebre Amarilla, Dengue-1, Chikungunya, Dengue-2 y West Nile (Screening)**

<b>Screening</b>			
	<b>Zika</b>	<b>% de ZIKV+</b>	<b>% del total</b>
<b>YFV</b>	16	35.56	19.75
<b>DEN1</b>	40	88.89	49.38
<b>CHIK</b>	19	42.22	23.46
<b>DEN2</b>	30	66.67	37.04
<b>WNV*</b>	25	55.56	30.86

**Nota:**

**% de ZIKV+** corresponde al porcentaje de muestras positivas simultáneamente para ZIKV y otro arbovirus, dentro de las 45 muestras positivas para ZIKV.

**% del total** corresponde al porcentaje de muestras positivas simultáneamente para ZIKV y otro arbovirus dentro del total de 81 muestras.

\* Solo 45 de las 81 muestras fueron probadas para WNV, por lo que el valor de 25 seguramente está subestimado



## SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

### Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (Titulación End Point)

Aquellas muestras que fueron positivas para ZIKV, DEN-1, DEN-2, CHIKV y/o YFV en el screening, se titularon por medio del ensayo HI.

En la titulación se descartaron aquellos resultados cuyos títulos fueran menores de 1:20 y aquellos que correspondían a reactividad cruzada. (**Ver Anexos 1 y 2**)

Los porcentajes de sueros positivos fueron los siguientes: Dengue-1 (30.86%), Chikungunya (30.86%), Zika (14.81%), Dengue-2 (8.64%) y Fiebre Amarilla (1.23%). Como se muestra en la **Tabla 5**. No se titularon los sueros positivos para West Nile, sin embargo, dos muestras que fueron positivas para WNV no eran positivas para ningún otro flavivirus, sugiriendo la positividad de WNV y por tanto su circulación entre la población de Ibadán.

**Tabla 5. Resultados de las pruebas de Inhibición de Hemaglutinación (Titulación) para Dengue-1, Chikungunya, Zika, Dengue-2 y Fiebre Amarilla en 81 muestras de suero humano**

	DEN1		CHIKV		ZIKV <sup>b</sup>		DEN2		YFV	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
<b>Total Positivo<sup>a</sup></b>	24	29.63	24	29.63	11	13.58	7	8.64	1	1.23
<b>Total Negativo</b>	22	27.16	2	2.47	25	30.86	27	33.33	17	20.99

**Nota:**

<sup>a</sup> No se contaron como positivas las muestras con títulos de 1:20 o menos. Se tuvo en cuenta la reactividad cruzada entre Flavivirus y se descartaron aquellos con 2 títulos menos en comparación al virus con el título más alto para la misma muestra.

<sup>b</sup> 36 de las 45 muestras ZIKV+ fueron tituladas.

De las 11 muestras positivas para Zika, 2 fueron también positivas para Dengue-1 (2.47%), 2 para Chikungunya (2.47%), 2 para Dengue-2 (2.47%) y ninguna para Fiebre Amarilla; como se aprecia en la **Tabla 6**.

# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

**Tabla 6. Comparación de positividad de Zika con Fiebre Amarilla, Dengue-1, Chikungunya, y Dengue-2 (Titulación End Point)**

	Titulación		
	ZIKV	% de ZIKV+	% del total
<b>YFV</b>	0	0.00	0.00
<b>DENV1</b>	2	14.29	2.47
<b>CHIKV</b>	2	14.29	2.47
<b>DENV2</b>	2	14.29	2.47

**Nota:**

**% de ZIKV+** corresponde al porcentaje de muestras positivas simultáneamente para ZIKV y otro arbovirus, dentro de las 11 muestras positivas para ZIKV.

**% del total** corresponde al porcentaje de muestras positivas simultáneamente para ZIKV y otro arbovirus dentro del total de 81 muestras.

### *Discusión*

Las enfermedades arbovirales representan una carga de salud a nivel global. Tan solo el Dengue produce 390 millones de infecciones cada año (intervalo creíble del 95%: 284 a 528 millones), de los cuales 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (cualquiera que sea la gravedad de la enfermedad); una gran mayoría de los casos son asintomáticos, por lo que el número real de casos está insuficientemente notificado y muchos están mal clasificados, según el informe de la OMS en el 2020. Los cambios climáticos, socioeconómicos y de movilización humana han permitido la propagación de virus previamente confinados a nichos ecológicos específicos a nuevas áreas geográficas (Agarwal, Parida, Dash, 2017). Sin embargo, estas enfermedades afectan más a las comunidades y países más pobres del planeta y son causantes de síndromes febriles que pueden ser graves y provocar discapacidades a corto y largo plazo.

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

El descuido en la atención de las infecciones por arbovirus en Nigeria, así como en otros países de África es preocupante. El diagnóstico erróneo ha desempeñado un papel en la subestimación de la carga de las enfermedades arbovirales. Estas imitan por sus síntomas a otras infecciones, como la malaria aguda, y con frecuencia se diagnostican como tal. Las medidas de prevención que se toman frente a la malaria no siempre son efectivas contra la transmisión de arbovirus que ocurre gracias a los mosquitos *Aedes* y *Culex* que se alimentan durante el día y al aire libre. Los mosquitos *Anopheles*, transmisores de la malaria, tienen actividad nocturna, y suelen ser controlados efectivamente con el uso de toldos durante la noche y fumigación en el interior de las viviendas (LaBeaud, Bashir, King, 2011).

La extensa reactividad cruzada serológica entre los miembros del género *Flavivirus* también representa un desafío en el diagnóstico de infecciones arbovirales. Inicialmente, el análisis de las muestras por el método de ELISA anti-ZIKV basado en NS-1 realizado en el University College Hospital de Ibadán reveló una seroprevalencia del 53.08% con 198 de 343 muestras positivas. Esto contrasta con los resultados de Mathé et al., (2018), quienes también realizaron pruebas serológicas de detección de anticuerpos contra ZIKV utilizando ELISA anti-ZIKV basado en NS-1 y obtuvieron una prevalencia del 9% en mujeres del Centro-Norte de Nigeria; y con los resultados obtenidos por Otu et al., (2020) donde se halló una seroprevalencia del 20% en personas del Sur-Oeste de Nigeria mediante una detección rápida de anticuerpos contra la inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina G (IgG) del ZIKV utilizando casetes cualitativos de inmunocromatografía de flujo lateral. Estos resultados sugieren una circulación y seroprevalencia diferencial en las tres regiones de Nigeria.

Mathé et al., aseguraron que su prueba fue altamente específica de acuerdo a los estudios de Steinhagen et al., (2016) y Gallian et al., (2017), los cuales comprobaron la confiabilidad del ELISA anti-ZIKV NS-1 al no detectar reactividad cruzada con anticuerpos de Dengue en muestras de individuos asintomáticos que viven en áreas endémicas de DENV.

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

ELISA anti-ZIKV NS-1 es adecuado para el diagnóstico serológico de infecciones por ZIKV agudas y pasadas. La proteína recombinante NS-1 de ZIKV ha probado ser una estructura diana altamente específica para la respuesta inmune; se sabe que al igual que para DENV y West Nile, NS-1 es secretada por las células infectadas en el torrente sanguíneo, estimulando el sistema inmune para producir elevados títulos de anticuerpos anti NS-1 (Alcon et al., 2002). La proteína NS-1 de los flavivirus ocurre en tres poblaciones diferentes: (i) Después de la translocación al lumen del retículo endoplasmático, un homodímero NS1 asociado a la membrana juega un papel esencial en la replicación del ARN viral (Youn et al., 2012). (ii) El dímero NS1 también se asocia con la membrana plasmática de las células infectadas con flavivirus, y (iii) NS1 se secreta de las células infectadas en forma de un hexámero (trímero de dímeros) que une las moléculas de lípidos en una cavidad central (Gutsche et al., 2011).

Con base en lo expuesto previamente, se determinó que la alta seropositividad hallada en el primer tamizaje realizado en Nigeria por el método de ELISA anti NS-1 no se debió a una reactividad cruzada con otros flavivirus, rechazando la hipótesis que se planteó en un inicio, la cual estipulaba que *la alta seropositividad del primer tamizaje realizado en Nigeria, se debe a una reactividad cruzada con los flavivirus Dengue-1, Dengue-2 y Fiebre Amarilla.*

Otro punto a tener en cuenta es que, en el presente estudio, se encontró que un 28.40% de todas las muestras analizadas no tenían anticuerpos para ninguno de los arbovirus probados, lo que contrasta con el análisis previo de ELISA realizado en Ibadán las cuales en su totalidad fueron positivas para IgM o IgG de Zika NS-1.

Los anticuerpos IgM contra los antígenos de flavivirus se producen dentro de los primeros 4 a 7 días después de la infección, y los anticuerpos IgG aparecen unos días después. Si el suero contiene anticuerpos anti NS-1, debería también contener anticuerpos que se unen a la hemaglutinina viral (HA) y que neutralicen las partículas virales. La proteína recombinante NS-1 ha probado ser altamente específica para la detección de flavivirus, por lo que es lógico que los

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

anticuerpos anti NS-1 no se unan a la superficie de la partícula viral (antígeno usado en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación). El ensayo HI identifica anticuerpos HA que previenen la aglutinación de los glóbulos rojos bloqueando el sitio de unión; el método de ELISA parece ser más sensible que el ensayo HI, especialmente en la detección de bajos niveles de anticuerpos, debido a su bajo ruido de fondo. (Trombetta, Remarque, Mortier, Montomoli, 2018). Sin embargo, Lustig et al. (2017) advierten que el método de ELISA basado en NS1 tiene problemas de sensibilidad. Dichos autores encontraron un 79% de sensibilidad de IgM en los primeros 26 días del inicio post-síntomas, lo que sugiere que pueden ocurrir resultados falsos negativos en la detección de IgM. Del mismo modo, se observó una sensibilidad del 79% para las pruebas de IgG a partir del día 8 del inicio post-síntomas.

A pesar de que el ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación no discrimina entre las clases de anticuerpos y es muy susceptible a la reactividad cruzada, los resultados se pueden discernir de acuerdo a los títulos de anticuerpos. De esta manera, en el presente estudio, se obtuvo un 13.58% (11 de 81 muestras) de seropositividad para Zika.

Siendo Nigeria una región endémica de arbovirus, era de esperarse que existiese una alta seropositividad para Dengue y Chikungunya, de hecho, la seropositividad más alta correspondió a Dengue -1 (29.63%) y a Chikungunya (29.63%). En Ibadán, la cepa de Dengue-1 circula en mayor medida que la cepa de Dengue-2 que tiene una seropositividad del 8.64% de acuerdo a este estudio. Una de las muestras tuvo un elevado título (1:640) para el virus de la Fiebre Amarilla. No se tiene información sobre la población a la que pertenecen las muestras, pero es probable que se tratase de vacunación reciente. Esta misma muestra presentó títulos altos para todos los flavivirus, los cuales no se contaron como positivos debido a la reactividad cruzada.

Dos muestras fueron positivas simultáneamente para Dengue-1 y Zika (2.47%), 2 para Chikungunya y Zika (2.47%) y 2 para Dengue-2 y Zika (2.47%). Es probable que se tratase de casos de coinfección.

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

Mediante el ensayo HI no es posible distinguir entre los casos de infección pasada y la reactividad cruzada, por lo que no se puede estimar con exactitud la proporción entre estos dos eventos. Sin embargo, en el primer tamizaje se pudo observar la positividad simultánea entre flavivirus, que luego fue despejada mediante la titulación. Un 88.89% de las muestras que fueron positivas para Zika también lo fueron para Dengue-1, 66.67% para Dengue-2 y 35.56% para Fiebre Amarilla. Esto se debe a la alta circulación de DENV en Ibadán, o bien a que las cepas de DENV reaccionan fuertemente con los anticuerpos de ZIKV. Adicionalmente, se realizó un screening para el virus West Nile en 45 muestras. 31 resultaron positivas, el 80.64% de ellas también fueron positivas para Zika.

Adebanjo et al., (2017), advierten que las pruebas serológicas se ven afectadas por el momento de la recolección de muestras. Para las mujeres embarazadas, esto puede dificultar determinar si la infección ocurrió antes o durante el embarazo actual. Además, la interpretación se ve aún más complicada en personas previamente infectadas o vacunadas contra un flavivirus relacionado.

La cepa africana de ZIKV circula en Nigeria (Mathé et al., 2018), y actualmente no hay evidencia de un brote de Zika en curso. Sin embargo, hay información disponible limitada y puede haber demoras en la detección y notificación de nuevos casos.

En África los casos de Zika en embarazadas pasan casi desapercibidos debido a que la microcefalia causada por el Síndrome de Zika Congénito se ha presentado en raras ocasiones. Esto no significa que la cepa africana de Zika sea menos dañina para las células embrionarias, al contrario, parece ser que su efecto citopático es tan nocivo que provoca la pérdida del embarazo (Sheridan et al., 2018), por lo que la vigilancia de ZIKV es crucial.

Según los resultados obtenidos en este estudio, como en estudios recientes (Mathé et al., 2018; Otu et al., 2020), un gran porcentaje de la población de Nigeria es susceptible a ZIKV. Es importante mantener una vigilancia activa puesto que ya se ha reportado la circulación de la cepa

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

americana, perteneciente al linaje asiático, en África gracias a un estudio realizado en Angola en 2019 de muestras almacenadas y de casos locales de microcefalia, que confirmó casos de infecciones con la cepa americana con base en el análisis completo del genoma del virus. Los análisis genéticos y otros datos indican que ZIKV fue introducido a Angola desde Brasil entre julio de 2015 y junio de 2016 (Hill et al., 2019). Un brote de Zika causado por las cepas del linaje asiático, adaptado a la transmisión urbana, podría impactar gravemente al continente africano, así como ocurrió en América Latina y el Caribe. Los estragos de la epidemia se reflejaron en el enorme impacto económico que tuvo sobre los países afectados; a largo plazo, los costos más importantes son los gastos directos e indirectos asociados a la microcefalia y al Síndrome de Guillain-Barré. De acuerdo a la PNUD (2017), los costos médicos de por vida de los casos de microcefalia podrían aproximarse a los 900 millones de dólares, sin contar las millonarias pérdidas económicas por el declive del turismo internacional. Sin embargo, se carece de estimaciones específicas por país y es probable que varíen de forma notable.

### ***Conclusión***

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la prevalencia de Zika entre las mujeres embarazadas de la región de Ibadán, Nigeria y distinguir la seropositividad de Zika con Dengue-1, Dengue-2, Fiebre Amarilla y Chikungunya, mediante el Ensayo de Inhibición de Hemoaglutinación.

Se encontró una baja seropositividad de ZIKV (13.58%) en mujeres embarazadas de Ibadán, suroeste de Nigeria. La prueba de HI, es el test clásico de tamizaje inicial de arbovirus y el más económico en su implementación. No obstante, los resultados no son completamente confiables debido a la alta reactividad cruzada y la imposibilidad de distinguir entre los diferentes tipos de anticuerpos, por lo que no fue posible proporcionar un valor preciso para las tasas de reactividad cruzada, coinfección e infección pasada. Sin embargo, se encontró una

## **SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

considerable seropositividad de Dengue-1 (29.63%) y el virus Chikungunya (29.63%), seguido de Dengue-2 (8.645) y Fiebre amarilla (1.23%), lo cual demuestra la alta tasa de transmisión de flavivirus en esta región de Nigeria, generando una tasa de morbilidad importante desde el punto de vista social.

La prueba ELISA basada en NS-1 ha demostrado ser mucho más sensible y confiable para la detección de infecciones flavivirales agudas y pasadas, en su mayoría no se ve afectada por la reactividad cruzada y es más sensible debido a su bajo ruido de fondo en comparación al ensayo HI. Por lo tanto, los resultados inicialmente encontrados en el University College Hospital en Ibadán deberían ser confiables y es posible que exista una alta seroprevalencia de Zika en dicha población.

No obstante, se necesitan más análisis poblacionales para confirmar estos resultados, ya que la vigilancia del ZIKV es una prioridad, especialmente entre las mujeres embarazadas. La cepa africana provoca microcefalia en muy raras ocasiones, pero no se deben subestimar sus efectos en el embrión durante las primeras semanas del embarazo, ya que estudios recientes han demostrado que esta cepa tiene un efecto más severo sobre las células embrionarias, el cual probablemente resultaría en la pérdida del embarazo, en lugar de permitir un mayor desarrollo fetal con daño cerebral acompañante. Por estas razones, sería importante también, llevar a cabo análisis filogenéticos de las cepas de Zika que se encuentran circulando actualmente en Ibadán, para estimar los patrones de transmisión y poder prevenir posibles brotes futuros causados por las cepas del linaje asiático que causan microcefalia y tienen un impacto socioeconómico más fuerte.



# SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

## *Agradecimientos*

A Divya Mirchandani, Msc. por su guía técnica en el laboratorio. A los doctores Scott Weaver, Kenneth Plante y Jessica Plante por la iniciativa de este trabajo. A todo el equipo de WRCEVA y a los departamentos de Relaciones Internacionales de la UISEK y la UTMB.

Proyecto P011617\_2 financiado por la Dirección de Investigación e Innovación.

## *Literatura citada*

Adebanjo, T., Godfred-Cato, S., Viens, L., Fischer, M., Staples, J. E., Kuhnert-Tallman, W., ...

Zahn, C. M. (2017). Update: Interim Guidance for the Diagnosis, Evaluation, and Management of Infants with Possible Congenital Zika Virus Infection — United States, October 2017. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 66(41), 1089–1099.

<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6641a1>

Agarwal, A., Parida, M., & Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Reviews in Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/rmv.1941>

Alcon, S., Talarmin, A., Debruyne, M., Falconar, A., Deubel, V., & Flamand, M. (2002).

Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 376–381. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.02.376-381.2002>

Barret, A. D. ., & Weaver, S. C. (2012). Arboviruses: alphaviruses, flaviviruses and bunyaviruses. In D. Greenwood, M. Barer, R. Slack, & W. Irving (Eds.), *Medical Microbiology: Eighteenth Edition* (Vol. 3, pp. 400–410). Churchill Livingstone.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4089-4.00056-1>

## SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

- Basu, R., & Tumban, E. (2016). Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. *Virology Journal*, *13*(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0623-2>
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of General Virology*, *70*(1), 37–43. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-1-37>
- Casals, D. H., & Clarke, J. (1958). Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses, 561–573.
- Dick G. (1952). Zika isolation and serological specificity. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, *46*(5), 509–520.
- Filipe, A. R., Martins, C. M. V., & Rocha, H. (1973). Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, *43*(4), 315–319. <https://doi.org/10.1007/BF01556147>
- Freeman, G., Perera, R. A. P. M., Ngan, E., Fang, V. J., Cauchemez, S., Ip, D. K. M., ... Cowling, B. J. (2016). Quantifying homologous and heterologous antibody titre rises after influenza virus infection. *Epidemiology and Infection*, *144*(11), 2306–2316. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000583>
- Kaufmann, L., Syedbasha, M., Vogt, D., Hollenstein, Y., Hartmann, J., Linnik, J. E., & Egli, A. (2017). An optimized hemagglutination inhibition (HI) assay to quantify influenzaspecific antibody titers. *Journal of Visualized Experiments*, *2017*(130). <https://doi.org/10.3791/55833>
- Gallian, P., Cabié, A., Richard, P., Paturel, L., Charrel, R. N., Pastorino, B., ... de Lamballerie, X. (2017). Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique. *Blood*, *129*(2), 263–266. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-737981>

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

- Gutsche, I., Coulibaly, F., Voss, J. E., Salmon, J., d'Alayer, J., Ermonval, M., ... Flamand, M. (2011). Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 8003–8008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017338108>
- Haddow, A. D., & Woodall, J. P. (2016, October 1). Distinguishing between Zika and Spondweni viruses. *Bulletin of the World Health Organization*. World Health Organization. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.181503>
- Hallauer C. (1946). Über den VirusimcInvcis mit dem Ilirst-Tcst. *Institut Für Hygiene Und Bakteriologie Der Universität Bern*.
- Hill, S. C., Vasconcelos, J., Neto, Z., Jandondo, D., Zé-Zé, L., Aguiar, R. S., ... Faria, N. R. (2019). Emergence of the Zika virus Asian lineage in Angola. *BioRxiv*, 520437. <https://doi.org/10.1101/520437>
- Hirst, G. K. (1941). The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with Influenza virus. *Science*, 94(2427), 22–23. <https://doi.org/10.1126/science.94.2427.22>
- LaBeaud, A. D., Bashir, F., & King, C. H. (2011). Measuring the burden of arboviral diseases: The spectrum of morbidity and mortality from four prevalent infections. *Population Health Metrics*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1478-7954-9-1>
- Lustig, Y., Zelena, H., Venturi, G., Van Esbroeck, M., Rothe, C., Perret, C., ... Schwartz, E. (2017). Sensitivity and Kinetics of an NS1-Based Zika Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Zika Virus-Infected Travelers from Israel, the Czech Republic, Italy, Belgium, Germany, and Chile. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6), 1894–1901. <https://doi.org/10.1128/JCM.00346-17>
- Marchette, N. J., Garcia, R., & Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 18(3), 411–415. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1969.18.411>

## SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN

- Mathé, P., Egah, D. Z., Müller, J. A., Shehu, N. Y., Obishakin, E. T., Shwe, D. D., ... Panning, M. (2018). Low Zika virus seroprevalence among pregnant women in North Central Nigeria, 2016. *Journal of Clinical Virology*, *105*, 35–40.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.011>
- Noor, R., & Ahmed, T. (2018). Zika virus: Epidemiological study and its association with public health risk. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(5), 611–616.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.007>
- Opayele, A. V., Adekunle, A. J., Ibrahim, K. T., & Olaleye, D. O. (2017). Influence of Meteorological Variables on Diversity and Abundance of Mosquito Vectors in Two Livestock Farms in Ibadan, Nigeria: Public Health Implications. *Journal of Mosquito Research*. <https://doi.org/10.5376/jmr.2017.07.0009>
- Otu, A. A., Udoh, U. A., Ita, O. I., Hicks, J. P., Ukpeh, I., & Walley, J. (2020). Prevalence of Zika and malaria in patients with fever in secondary healthcare facilities in south-eastern Nigeria. *Tropical Doctor*, *50*(1), 22–30. <https://doi.org/10.1177/0049475519872580>
- Pedroso, C., Fischer, C., Feldmann, M., Sarno, M., Luz, E., Moreira-Soto, A., ... Drexler, J. F. (2019). Cross-protection of dengue virus infection against congenital Zika syndrome, northeastern Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, *25*(8), 1485–1493.  
<https://doi.org/10.3201/eid2508.190113>
- PNUD. (2017). Evaluación del impacto socioeconómico del virus del Zika en América Latina y el Caribe: Brasil, Colombia y Surinam como estudios de caso. Retrieved from <http://www.ifrc.org/Global/Photos/Secretariat/201702/UNDP-Zika-04-05-2017-Spanish-WEB.pdf>
- Sheridan, M. A., Balaraman, V., Schust, D. J., Ezashi, T., Michael Roberts, R., & Franz, A. W. E. (2018). African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. *PLoS ONE*, *13*(7), 1–18.

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200086>

Shiryayev, S. A., & Strongin, A. Y. (2010). Structural and functional parameters of the flaviviral protease: a promising antiviral drug target. *Future Virology*, 5(5), 593–606.

<https://doi.org/10.2217/fvl.10.39>

Shope, R. E. (1963). The use of a micro hemagglutination- inhibition test to follow antibody response after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Anais de Microbiologia*, 11, 167–169.

Singh, R. K., Dhama, K., Malik, Y. S., Ramakrishnan, M. A., Karthik, K., Tiwari, R., ... Joshi, S. K. (2016). Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 36(3), 150–175. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1188333>

Steinhagen, K., Probst, C., Radzimski, C., Schmidt-Chanasit, J., Emmerich, P., van Esbroeck, M., ... Schlumberger, W. (2016). Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveillance : Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 21(50).

<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426>

Trombetta, C. M., Remarque, E. J., Mortier, D., & Montomoli, E. (2018). Comparison of hemagglutination inhibition, single radial hemolysis, virus neutralization assays, and ELISA to detect antibody levels against seasonal influenza viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 12(6), 675–686. <https://doi.org/10.1111/irv.12591>

Wen, J., & Shresta, S. (2019). Antigenic cross-reactivity between Zika and dengue viruses: is it time to develop a universal vaccine? *Current Opinion in Immunology*, 59(3), 1–8.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.02.001>

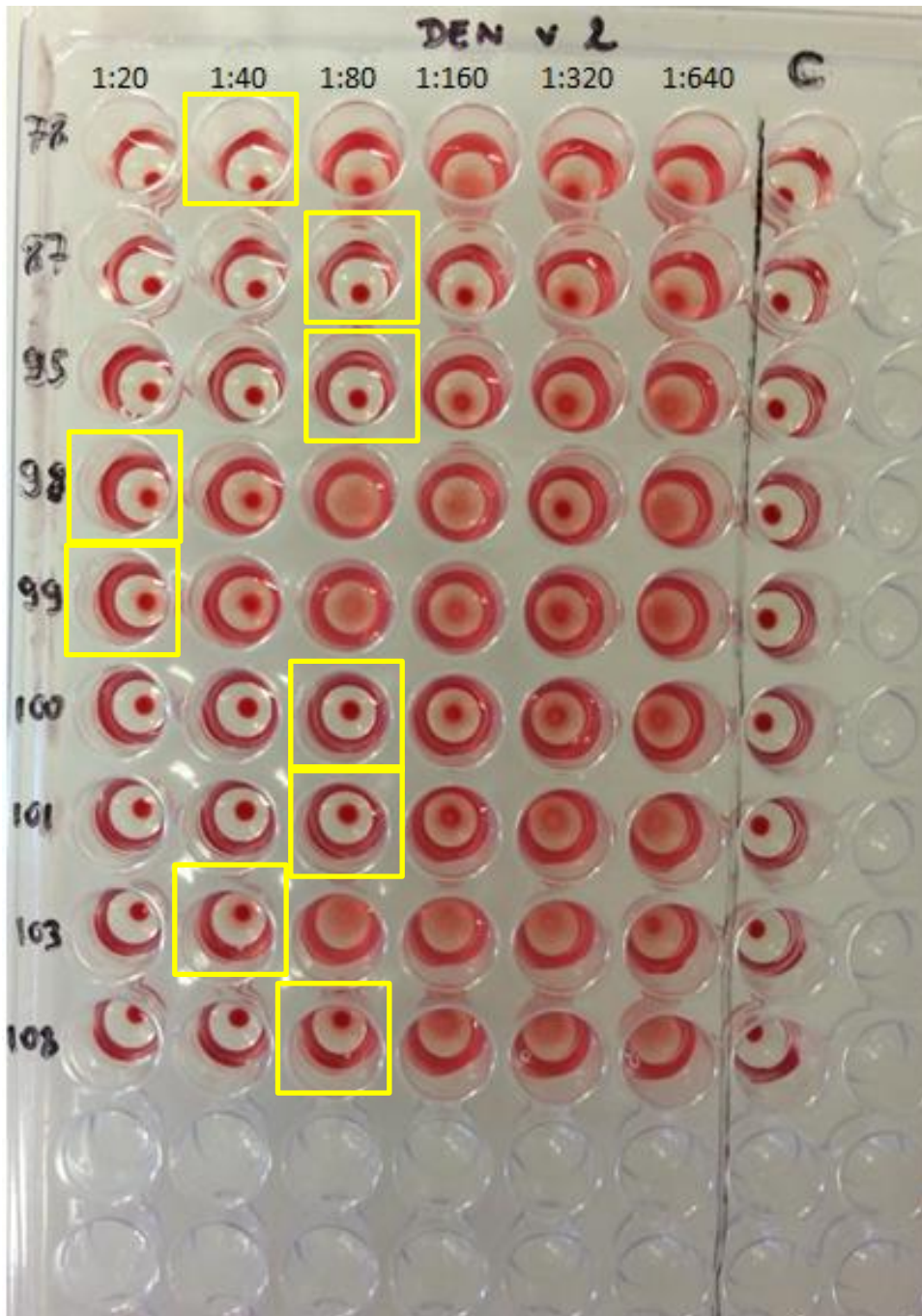
Youn, S., Li, T., McCune, B. T., Edeling, M. A., Fremont, D. H., Cristea, I. M., & Diamond, M.

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

S. (2012). Evidence for a genetic and physical interaction between nonstructural proteins NS1 and NS4B that modulates replication of West Nile virus. *Journal of Virology*, 86(13), 7360–7371. <https://doi.org/10.1128/JVI.00157-12>

**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

**ANEXO 1. Figuras. Titulación de antígeno DEN-2 en el ensayo HI para muestras 78 a 108. Título final en amarillo.**



**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE**

**NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

**ANEXO 2. Tabla de datos. Titulación de antígenos, ensayo HI. Positivos resaltados en amarillo. NP= no probado.**

Sample Number	YFV	DEN-1	CHIKV	ZIKV	DEN-2	WNV
01		1:20	1:40			NP
02	1:20	1:80		1:160	1:160	NP
03		1:20	1:80	1:20		NP
04		1:20		1:80	1:80	NP
06						NP
09						NP
11						NP
12	1:80	1:320		1:320	1:20	NP
13						NP
15	1:80	1:320		1:40	1:40	NP
17		1:20			1:20	NP
18		1:40		1:20		NP
20						NP
21		1:40	1:40	1:20		NP
22		1:40	1:40	1:40	1:160	NP
23						NP
24		1:40		1:20		NP
25						NP
26		1:40		1:40	1:40	NP
27						NP
28		1:40		1:40	1:20	NP
29						NP
30		1:40	1:40	1:320	1:80	NP
31	1:20	1:80		1:40	1:20	NP
32						NP
33		1:40		1:20	1:40	NP
34		1:20	1:40	1:40		NP
36		1:40	1:40	1:20		NP
37						NP
39						NP
40		1:40	1:20	1:80	1:40	NP
41		1:80	1:80	1:40	1:40	NP
42						NP
44						NP
45		1:160		1:40	1:40	NP
46		1:20		1:20		NP
47	1:20	1:320		1:80	1:160	+
48						
50	1:40	1:320		1:80	1:80	+



**SEROPREVALENCIA DE ARBOVIRUS EN EMBARAZADAS DEL SUROESTE DE  
NIGERIA MEDIANTE PRUEBAS DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN**

51						
52	1:160	1:640		1:320	1:80	+
54						
55			1:20			
56	1:40	1:160	1:40	1:40	1:80	+
58						
59	1:40	1:160	1:320	1:80	1:40	+
61	1:20	1:160		1:80	1:80	+
62	1:40	1:320		1:320	1:40	+
63						
64	>1:640	1:320		1:320	1:320	+
67		1:20		1:20	1:80	+
71				1:20		+
74	1:40	1:160	1:160	1:80	1:80	+
75						
76			1:160		1:40	
77	1:20	1:160		1:20	1:160	+
78		1:20			1:40	+
79				1:80		+
84						
85		1:80				+
87	1:40	1:80	1:160	1:80	1:80	+
88						
89			1:80			+
90				1:80		+
92				1:80		
93						+
95		1:40	1:320	+	1:80	
96			1:640			
97			1:640			+
98		1:40	1:160	+	1:20	+
99		1:20		+		+
100		1:80		+		+
101	1:40	1:160			1:80	+
102	1:20	1:160		+	1:80	+
103		1:40	1:40	+	1:40	+
104			1:40			+
105		1:160	1:40	+		+
106			1:40	+		+
107			1:40			+
108	1:20	1:80	1:40	+	1:80	+
109		1:160				+

**Nota:** Para CHIKV se consideraron positivos todos los resultados a partir de los títulos de 1:40, puesto que no hay reactividad cruzada con Flavivirus.